

⑩ 日本国特許庁 (J P)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A) 平2-59526

⑬ Int. Cl.⁵

A 61 K 37/02
39/395

識別記号

ADY

S
C

庁内整理番号

8615-4C
8829-4C
8829-4C

⑭ 公開 平成2年(1990)2月28日

C 07 K 3/08
15/12
15/18

8318-4H
8318-4H

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全3頁)

⑮ 発明の名称 アジドチミジン-蛋白質複合体及びその製法

⑯ 特 願 昭63-210588

⑰ 出 願 昭63(1988)8月26日

⑱ 発 明 者 井 上 國 世 神奈川県相模原市相模大野7丁目37番17-402号

⑲ 発 明 者 京 田 高 裕 神奈川県藤沢市湘南台4丁目26番地の5 サンパレス湘南306

⑳ 発 明 者 中 井 益 代 兵庫県尼崎市浜2丁目5番8号

㉑ 出 願 人 東 ソ ー 株 式 会 社 山口県新南陽市大字富田4560番地

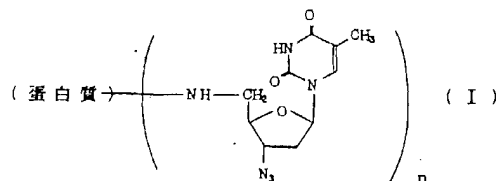
明 細 書

1 発明の名称

アジドチミジン-蛋白質複合体及びその製法

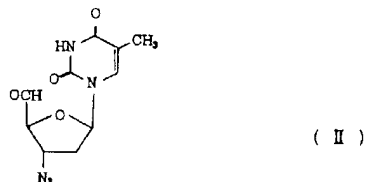
2 特許請求の範囲

- (1) 下記一般式 (I) の構造をもつ 3'-デオキシ-3'-アジドチミジン-蛋白質複合体、



(n は正の整数)

- (2) 3'-デオキシ-3'-アジドチミジン誘導体 (II)



の 5' 位の C H O と蛋白質のアミノ基との間でシッフ塩基を形成させた後、還元すること
を特徴とする請求項 1 記載の複合体の製法。

3 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

3'-デオキシ-3'-アジドチミジン (以下、A Z T) は、近年、抗エイズ作用を含め広範なレトロウイルスに対する有効性が知られてきた薬物である。

本発明は、A Z T の 5' 位と蛋白質とを結合させた複合体に関する。

[従来の技術]

A Z T は、それ自体、抗ウイルス剤として、実用化されているが、重篤な骨髓細胞抑制や肝中球減少などの副作用があり、問題点が多い。そのため蛋白質に A Z T を担持させたものが研究されている。例えば、抗ウイルス抗体を蛋白質として用いると抗ウイルス作用を持ったミサイル療法薬としての効果が期待できる。また、直接、抗ウイル

ス抗体に結合すると、抗体の活性を損ねることも考えられるが、その場合ある蛋白質をスパーサーとして用いることが考えられ、適当な蛋白質を結合した複合体も研究されている。

〔発明が解決しようとする課題〕

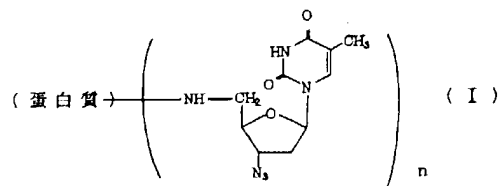
上述のように蛋白質にA Z Tを担持させたものは種々研究されているが、本発明は新たな結合部位により結合されたA Z T-蛋白質複合体及びその製法を提供することを目的とするものである。

〔課題を解決するための手段及び作用〕

本発明者らは上記課題に関し鋭意検討した結果、本発明に到達した。

即ち本発明は、

(1) 下記一般式 (I) の構造をもつ3'-デオキシ-3'-アジドチミジン-蛋白質複合体。



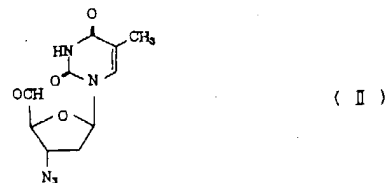
ク・ケミストリー第49巻、4735頁、1984年に準じて行なうことができる。

このようにして合成したA Z T誘導体 (II) と、蛋白質を結合させ、A Z T-蛋白質複合体 (I) を得るが、この蛋白質については、特に限定しない。具体的には、種々のマウス、ヒト、ラットなどのモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、各種動物の血清アルブミン、トランスフェリン、リゾチーム、フィブリン、フェツイン、アクチン、ミオシン、ポリーレーリジン、ポリーレーグルタミン酸などを例示することができる。種々の用途により、適当な蛋白質を選択することが可能である。また、アルキルアミン等を用いることもできる。

上記したA Z T誘導体 (II) と蛋白質との結合は、例えば蛋白質分子中の遊離アミノ基と、A Z T誘導体 (II) の5'位のアルデヒド基とを反応させシッフ塩基を形成させた後、温和な還元剤で処理し、アルキルアミノ誘導体へと誘導することにより行なうことができる。この反応は、公

(nは正の整数)

(2) 3'-デオキシ-3'-アジドチミジン誘導体 (II)



の5'位のC H Oと蛋白質のアミノ基との間でシッフ塩基を形成させた後、還元することとを特徴とする請求項1記載の複合体の製法である。

A Z T-蛋白質複合体 (I) は例えばA Z T誘導体 (II) と蛋白質とを結合させればよい。

A Z T誘導体 (I) はA Z Tの5'位の第1級アルコールをアルデヒドへ変換することにより得ることができる。この方法は、公知の酸化方法を用いて行なうことができる。例えば、酸化クロム (VI) -ピリジン錯体による酸化方法 (コーレイとサムエルソン; ジャーナル・オブ・オーガニッ

知の方法を用いれば良く、具体例をあげれば10 mM炭酸緩衝液 (pH 9.5) 中で両者を一昼夜4℃で反応した後、NaBH₄を用い、4℃で還元すれば良い。なお反応後、ゲル濾過、透析等の方法を用いて、未反応のA Z T誘導体 (II) を除去し、反応生成物として、本発明のA Z T-蛋白質複合体 (I) を得ることができる。

蛋白質1分子あたりに担持されるA Z Tの分子数nは用いられる蛋白質により異なるが、一例をあげるとヒト血清アルブミン1分子に対し、A Z T11分子が担持される。

〔発明の効果〕

本発明のA Z T-蛋白質複合体 (I) は、蛋白質として抗ウイルス抗体を用いれば、抗ウイルス作用をもったミサイル療法薬としての効果が期待できる。また、A Z Tに直接抗体を結合すると、抗体の活性を損ねることもあり、その場合に、本発明によってスパーサーとなる蛋白質を導入することができる。

本発明のA Z T-蛋白質複合体 (I) は本発明

方法によって作製することができる。

(実施例)

以下、本発明を実施例にてさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例にのみ限定されるものではない。

- (1) 酸化クロム(VI) (CrO_3) 20 mg、ビリジン 32.3 μl をジクロロメタン-N,N-ジメチルホルムアミド(以下、 CH_2Cl_2 -DMF とする) (4:1 v/v) 250 μl 中に懸濁し、15分間室温で攪拌した。これに、AZT 13.4 mg を CH_2Cl_2 -DMF (4:1 v/v) 200 μl に溶解したものと、無水酢酸 18.9 μl を転化し、5分間室温で攪拌、反応させた。反応後、エタノール 25 μl を添加した後、酢酸エチル 2.5 ml 中へ反応物を注ぎ、濾過を行なった。濾液について、TSK-gel Silica 60 (東ソー製) を用いて、酢酸エチルを展開溶媒として高速液体クロマトグラフィーを行ない、

5'位をアルデヒド基に酸化したAZT誘導体(II)を分離した。

- (2) 上記AZT誘導体(II) 2.7 mg とヒト血清アルブミン(以下、HSA という) 6.6 mg を 10 mM 炭酸緩衝液(pH 9.5)中で、室温で6時間インキュベーションを行なった後、10 μmol の NaBH_4 を添加し、4℃で一昼夜反応させた。これを、TSK-gel G-3000SW (東ソー製) (2.15×60 cm) を用いて、0.1 M リン酸緩衝液(pH 6.0)を展開溶液として、ゲル濾過を行ない、AZT誘導体(II)とHSAとの複合体(I)を分離精製した。収率は97%であった。

また、カルバゾール-硫酸法によるとHSA 1分子あたり11分子のAZTが担持されていた。

特許出願人 東ソー株式会社

DERWENT-ACC-NO: 1990-110454

DERWENT-WEEK: 199015

COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Azido:thymidine-protein composites
having anti-virus activity - arew prepd. by reacting
free amino radical of protein and aldehyde radical to form
Schiff base and reducing with sodium boro-hydride

PATENT-ASSIGNEE: TOSOH CORP[TOYJ]

PRIORITY-DATA: 1988JP-0210588 (August 26, 1988)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PAGES	PUB-DATE	
LANGUAGE		MAIN-IPC	
JP 02059526 A		February 28, 1990	N/A
000	N/A		

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO
APPL-DATE		
JP 02059526A	N/A	
1988JP-0210588	August 26, 1988	

INT-CL (IPC): A61K037/02, A61K039/39 , C07K003/08 ,
C07K015/12

ABSTRACTED-PUB-NO: JP 02059526A

BASIC-ABSTRACT:

3'-deoxy-3' -azidethylmidine- protein composite of formula
(I) where n is not
less than 1, is new.

3'-deoxy-3' -azidethylmidine deriv. (II) and amino radical
of a protein are
formed into Schiff's base, and reused to form the cpd. (I).
The AZT derivative

(II) is prepd. with aldehyde exchange of primary alcohol of 5' position of AZT.

The protein is not limitative, including a monoclonal antibody of human, mouse or rats, polyclonal antibody, blood serum albumin, transferrin, lysozyme, fibrin, actin, myosin, poly-L-lysine, poly-L-glutamic acid or alkylamine. In prepd. a free amino radical of a protein and aldehyde radical of 5' position of AZT derivative are reacted at 4 deg. C overnight in 10mM carbonic acid buffer (pH 9.5) to form Schiff's base, and reduced with NaBH4 at 4 deg. C to form a reaction prod. which is treated by gel filtration or dialysis for removal of unreacted AZT deriv. to obtain AZT-protein composite (I).

USE/ADVANTAGE - 3'-deoxy-3' -azidethymidine(AZT) is useful for the missilee therapy, having anti-virus activity.

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0

TITLE-TERMS: AZIDO THYMIDINE PROTEIN COMPOSITE ANTI VIRUS ACTIVE PREPARATION

REACT FREE AMINO RADICAL PROTEIN ALDEHYDE
RADICAL FORM SCHIFF BASE
REDUCE SODIUM BORO HYDRIDE

DERWENT-CLASS: B03

CPI-CODES: B04-B03A; B04-B04A6; B04-B04C5; B04-B04C6;
B04-B04D2; B04-C01;
B04-C03D; B07-A02; B12-A06;

CHEMICAL-CODES:

Chemical Indexing M1 *01*

Fragmentation Code

F011 F012 F014 F015 F019 F113 F199 F542 H100 H181
H2 H211 H212 H213 J011 J012 J013 J014 J171 J172
J371 J372 J373 J5 J522 J523 K0 K5 K510 K599
L8 L818 L821 L831 L834 M210 M211 M240 M281 M282
M283 M311 M313 M315 M321 M322 M323 M332 M342 M343
M349 M373 M381 M391 M392 M393 M423 M510 M522 M523
M530 M540 M710 M903 M904 P210 V600 V611 V616 V752
V761 V814 V901 V902 V917 V921

Markush Compounds

199015-16301-N
Registry Numbers
1327U 0502U

SECONDARY-ACC-NO:
CPI Secondary Accession Numbers: C1990-048545

PAT-NO: JP402059526A
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 02059526 A
TITLE: AZIDOTHYIMIDINE-PROTEIN COMPLEX AND
PRODUCTION THEREOF
PUBN-DATE: February 28, 1990

INVENTOR-INFORMATION:

NAME
INOUE, KUNIYO
KYODA, TAKAHIRO
NAKAI, MASUYO

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
TOSOH CORP	N/A

APPL-NO: JP63210588

APPL-DATE: August 26, 1988

INT-CL (IPC): A61K037/02, A61K039/395 , C07K003/08 ,
C07K015/12 , C07K015/18

ABSTRACT:

PURPOSE: To obtain an azidothymidine-protein complex bonded by a novel bond site.

CONSTITUTION: CHO at the 5'-position of 3'-deoxy-3'-azidothymidine(AZT) shown by formula I is reacted with amino group of protein to form a Schiff base, which is then treated with a mild reducing agent to give AZT-protein to give AZT-protein complex shown by formula II. Monoclonal antibody, polyclonal antibody of mouse, human, rat, etc., serum albumin,

lysozyme, fibrin, etc., of
various animals may be cited as the protein. When an
antiviral antibody is
used as the protein, the complex is expected to have
effects as missile therapy
having antiviral action.

COPYRIGHT: (C)1990,JPO&Japio